SUMO 蛋白酶 Ulp1 的高效表达纯化并通过 His-SUMO 标签制备 scFv

李诗洁[1,2,3]，杨艳坤[1,2,3]，刘萌[1,2,3]，白仲虎[1,2,3]，金坚[2,4*]

（1. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室，无锡 214122；2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，无锡 214122；3. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室，无锡 214122；4. 江南大学药学院，无锡 214122）

（2.

摘要:SUMO 蛋白酶（Ulp1）是切割小分子泛素修饰（SUMO）融合蛋白获得天然 N 端靶蛋白的一种工具酶，具有酶切效率高，特异性好等优点。但现有市售 SUMO 蛋白酶 Ulp1 价格昂贵，操作复杂，限制了 SUMO 融合体系的运用。利用基因工程技术，合成基因 *ulp1*（Leu403-Lys621），并在 N 端和 C 端加入多聚组氨酸标签（His_6），构建重组表达载体 psvT7-*ulp1*，将重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)和 BL21 trxB(DE3)中。经过高通量筛选技术快速确定最优的表达条件为采用 BL21(DE3)作为表达宿主，转接后 7 h 加入 IPTG，IPTG 的终浓度为 0.1 mmol/L，诱导时间为 16 h，最终蛋白表达量占菌体总蛋白的 34.5%，重组蛋白 Ulp1 的表达量为 190mg/L，通过 Ni-NTA 一步纯化即可得到纯度 95%以上的 Ulp1。通过酶切反应，测定酶活为 5.19 U/μl，比酶活为 5.23×10^4 U/mg，是先前报道比酶活的 1.87 倍，通过酶活动力学分析，Ulp1 的表观米氏常数 K_m=0.359 g/L，V_m=5.10μg/(mL·min)。将 SUMO 融合表达体系用于单链抗体（Single-Chain Antibody Fragment，scFv）的表达，得到可溶的 SUMO-scFv 融合蛋白，使用表达的 Ulp1 进行酶切并纯化，获得纯度高于 90%且 N 端不含多余氨基酸的 scFv,操作步骤简单，显著改善了 scFv 在大肠杆菌中难于高效可溶性表达纯化的现状。

关键词： Ulp1 Ni-NTA SUMO scFv 高效表达纯化

Efficient expression of SUMO protease Ulp1 and used to express and purified scFv by His-SUMO tag

LI Shi-jie[1,2,3],YANG Yan-kun[1,2,3], LIU Meng[1,2,3],BAI Zhong-hu[1,2,3], JIN Jian[2,4*]

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China;2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China;3. The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China.4. School of Pharmacy, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China.)

Abstract: SUMO protease (Ulp1) is an enzyme that cleaves small molecule ubiquitin-modified (SUMO) fusion protein into natural N-terminal protein,which has high efficiency and specificity.While the existing commercially available SUMO protease Ulp1 is expensive and complicated on operational level,limiting the wide application of SUMO fusion system.In this study,*ulp1* gene (Leu403-Lys621) was synthesized,with the poly-histidine tag[1] (His_6) added to

[1]收稿日期：2017-10-11，修回日期：不详

both the N-terminal and C-terminus of the SUMO protease(Ulp1).The recombinant expression vector psvT7-*ulp1* was constructed before the recombinant plasmids was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) and BL21 trxB(DE3) separately.The optimal expression conditions were as follows:*Escherichia coli* BL21 (DE3) was used as the expression host,and IPTG was added at 7 h after the transfer.The final concentration of IPTG was 0.1 mmol/L and the induction time was 16 h.The final recombinant protein Ulp1 was 190 mg/L accounted for 34.5% of the total protein in bacteria.Purified SUMO could be obtained through one-step Ni-NTA and the purity was higher than 95%.The enzymatic activity was 5.19 U/μl with a specific enzyme activity of 5.23×10^4U/mg,which was 1.87 folds of the previously reported,According to enzyme kinetic analysis,the apparent *K*m of Ulp1 was 0.359 g/L,and *V*m was 5.10 μg/(mL·min).The SUMO fusion expression system was then used to express the soluble SUMO-scFv fusion protein,with the expressed Ulp1 used for digestion and purification.The purity of scFv was higher than 90% and N-terminal natural scFv was obtained.In this study,A method was presented for preparation of Ulp1 with high enzyme activity and purity.The SUMO fusion expression system was successfully applied to the expression and purification of scFv with a simplified operation steps,which significantly improved the status of scFv soluble expression in *Escherichia coli.*

Keywords: Ulp1 Ni-NTA SUMO scFv high-performance purification

小分子泛素相关修饰蛋白（small ubiquitin-related modifier,SUMO）是一类泛素相关的蛋白，通过结合赖氨酸侧链来调节靶蛋白的功能[1]。SUMO 化是一个可逆的翻译后修饰过程，在真核细胞内发挥着及其重要的作用，如：转录、DNA 修复、DNA 重组、信号转导、蛋白质核转质运输和调节细胞周期等[2]。近年来，SUMO 已经成为一种有效的生物技术工具，通过 SUMO 与靶蛋白融合可以促进蛋白质折叠，增强蛋白质的可溶性表达，保护蛋白免受蛋白酶水解，提高蛋白质的稳定性，已经成功表达了 FGF21[3]、EGF [4]、KGF2[5]等。且 SUMO 融合蛋白可以被 SUMO 蛋白酶 Ulp1[6]特异性识别并切割，因此 SUMO 可以作为用于蛋白表达的理想标签。传统的蛋白酶如 factor Xa、烟草蚀刻病毒蛋白酶（TEV）、肠激酶和凝血酶等常用于标签的切除，但传统蛋白酶识别特定的氨基酸序列，由于空间阻遏导致切割蛋白酶酶切效率不高。Ulp1 与传统的切割酶不同，Ulp1 识别 SUMO 三级结构，特异性的切割 SUMO 标签 C 端的异肽键。迄今为止，已经切开了 100 种 SUMO 融合蛋白，未发现错误的剪切[7]。更重要的是，SUMO 融合蛋白切割后，靶蛋白的 N 端不含有多余的氨基酸。对于医药蛋白，先决条件是仅含有天然氨基酸序列，因此 SUMO 作为融合标签对医药蛋白的表达及纯化有重要的意义。

基金项目：863 项目（2015AA020802）
*通信作者：金坚，教授，电子信箱 ：jinjian31@126.com

随着单克隆抗体研究成功，抗体在医药领域发挥了越来越重要的作用，已经逐渐成为药物生产的主要方向。单链抗体(Single-chain antibodies,scFv)是人们构建出的一种融合蛋白，由抗体的重链的可变区和轻链的可变区通过一个短肽连接而成，分子大小一般在 27-30 KDa[8]。相比于完整抗体而言，其大小仅为完整抗体的 1/6，具有分子量小的特点，更容易穿过血管壁，能均匀的分布肿瘤和其他组织中[9]，且免疫原性更弱。因此，scFv 在人类疾病的诊断和治疗过程中发挥着越来越重要的作用。单链抗体的纯化有两种方法，最常用的是利用 protein A 和 protein L 层析柱进行纯化。protein A 有 5 个 Ig 结合区域[10]，主要与 IgG 的 Fc 结构域结合，同时研究发现，Protein A 还与重链可变区的 CDR2 和 CDR3 的 LYLQMNSL 序列有较弱的亲和性[11]，根据这一特点可以用于纯化 scFv。但是 Protein A 纯化抗体对抗体有一定的影响，会使抗体产生短暂的构像改变。而且 protein A 的结合能力与抗体的亚型和种类有关。Protein L 从 *Peptostreptococcus magnus* 中分离出来，对抗体可变区的 kappa 轻链有较强的亲和性，具体与抗体轻链的κ1，κ3，κ4 亚型结合，而不与κ2 和λ型结合[12]。所以 protein A 和 protein L 亲和柱并不适合所有 scFv 的纯化。另一种用于抗体纯化的方法则是融合亲和标签，常用的亲和标签有多聚组氨酸标签（His_6）、GST、FLAG、MBP 等，考虑到亲和标签对 scFv 功能的影响，常需要去除融合标签，得到不含多余氨基酸的靶蛋白。

SUMO 融合体系具有促进可溶性表达，促进蛋白正确折叠，保护蛋白免受蛋白酶水解的作用，且可以被 SUMO 蛋白酶特异性识别并切割，获得天然 N 端氨基酸序列的靶蛋白[13]。但 SUMO 蛋白酶 Ulp1 价格昂贵，且操作步骤复杂，限制了 SUMO 融合体系的运用。研究采用 psvT7 进行 Ulp1（403-621aa）的表达，并在 Ulp1 的 N 端和 C 端加入多聚组氨酸标签，通过条件优化，实现 Ulp1 的高效表达，且均为可溶性，一步纯化即可达到 95%以上的纯度。同时还运用 His-SUMO 融合表达体系进行 scFv 的表达，经过 Ni-NTA 纯化，得到融合蛋白 His-SUMO-scFv，使用纯化的 Ulp1 进行酶切，再次经过 Ni-NTA 纯化，得到 N 端无多余残基的 scFv。本研究不仅高效表达重组蛋白 Ulp1，得到高纯度高活性的 SUMO 蛋白酶，还简化了操作步骤，成功用于 scFv 的表达纯化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及主要试剂

BL21(DE3)由实验室保存；BL21 trxB(DE3)购自 Novagen/Millipore，该菌有利于目的蛋白在细胞质中形成二硫键；质粒 psvT7[14]（原名 pBY）由实验室保存；胰蛋白胨、 酵母提取物为 OXOID 公司产品；甘油、KH_2PO_4、NaCl、K_2HPO_4、$K_2HPO_4·3H_2O$、三羟基氨基甲烷、盐酸、咪唑来自于上海国药；限制性内切酶 *Nde* Ⅰ、 *Xho* Ⅰ、蛋白 marker、DNA marker 购自于 Thermofisher；Q5 DNA 聚合酶购自于 New England Biolabs；SDS、丙烯酰胺，过硫酸铵、考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒，四环素，IPTG 购自于上海生工；PCR 纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自于 AXYGEN；Ni agarose(1 ml)柱购自于 Roche；HiPrep 26/10 Desalting 购自 GE，HRP 标记的鼠抗 His_6 抗体购自于 proteintech。

表 1 本文所用的引物名称和序列

Table 1 Primers used in this study

Primers names	Primer sequences（5’-3’）
His-sumo-F	GGAATTCCATATGGGTCATCACCATCATCATCACG
sumo-R	CGGACCGCTTTGCACCAGCT
scFv-F	CAAATTCAGCTGGTGCAAAGCGG
scFv-R	CCGCTCGAGTTATTTGATCTCCAGTTTGGTACCG

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 psvt7-sumo-scFv 及 psvt7-ulp1 的构建

sumo 和 *scFv* 基因由苏州金唯智生物科技有限公司进行合成。使用 Q5 DNA 聚合酶通过聚合酶链反应（PCR）分别扩增基因 *sumo* 和基因 *scFv*。扩增 *sumo* 片段的引物为 His-sumo-F 和 sumo-R，扩增 *scFv* 片段的引物为 scFv -F 和 scFv –R。扩增产物 *sumo* 和 *scFv* 回收后重新作为 PCR 的模板，其中 *sumo* 基因与 *scFv* 基因有 26 bp 重叠，利用引物 His-sumo-F 和 scFv-R 进行 PCR 扩增，得到融合 PCR 片段 *sumo-scFv*，融合 PCR 得到的片段 *His-sumo-scFv* 与质粒 psvT7 同时进行酶切，酶切位点为 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ，回收后使用连接酶将酶切产物于 16 ℃进行连接，构建用于表达 SUMO-scFv 蛋白的重组质粒 psvT7-sumo-scFv（图 1）。

SUMO 蛋白酶 Ulp1 的氨基酸序列来自于 NCBI (Q02724)，其中氨基酸序列 403-621 表现出全长 Ulp1 的活性[15]，对序列 401-621aa 使用 Jcat 进行密码子优化，在序列的 N 端和 C 端均加入多聚组氨酸(His_6)标签，由苏州金唯智生物科技有限公司进行合成。将合成的序列 *ulp1* 与质粒 psvT7 同时进行酶切，酶切位点为 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ，回收后使用连接酶将酶切产物于 16 ℃进行连接，构建用于表达 Ulp1 的重组质粒 psvT7-ulp1。

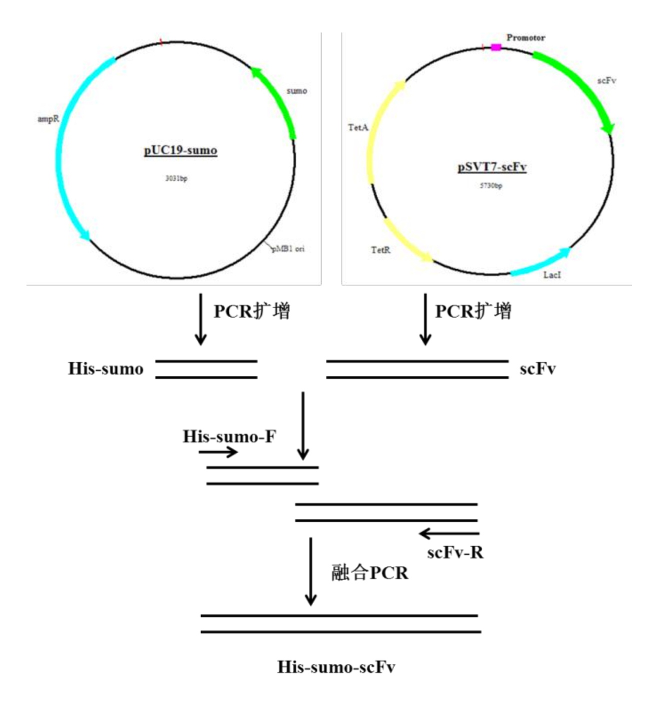


图 1 *His-sumo-scFv* 的合成流程

Fig 1 Schematic illustration of *His-sumo-scFv* synthesis

1.2.2 Ulp1 和 scFv 的诱导表达

将表达 SUMO 蛋白酶 Ulp1 的重组质粒 psvT7-ulp1 转入大肠杆菌 BL21(DE3)和 BL21 trxB(DE3)中，分别挑取两种不同宿主的单菌落接种于 LB 培养基中（含 15 μg/ml 四环素），30 ℃，230 rpm 摇瓶过夜培养，测定 OD_{600}，按照终 OD_{600} 为 0.05 转接到 25 ml TB/SB（含 15 μg/ml 四环素）发酵培养基中（蛋白胨 3 g、酵母提取物 6 g、KH_2PO_4 0.58 g、$K_2HPO_4·3H_2O$ 3.14 g、甘油 2.5 g，pH=7.0），取不同的诱导时间，诱导剂浓度，诱导温度的发酵液 1 ml，5000×g 收集菌体，每种诱导条件下的菌体称取 0.02 g，加入 1 ml PBS 重悬菌体，使用高通量破碎仪进行破碎，12000×g 离心取上清，加入 5×loading buffer，100 ℃处理 5 min，通过 SDS-PAGE 进行检测。收集最优表达条件下发酵的菌体 1 ml，8000×g 离心弃上清，加入 1 ml PBS 重悬菌体进行 SDS-PAGE 检测。同时将不同浓度的 BSA 标准品进行 SDS-PAGE 检测，以 BSA 标准品为参考条带，通过灰度分析，测定重组蛋白 Ulp1 的蛋白表达量。

将表达 SUMO-scFv 蛋白的重组质粒 psvT7-sumo-scFv 转入大肠杆菌 BL21 trxB(DE3)中，挑取单菌落，按以上发酵条件进行条件的优化。

1.2.3 SUMO 蛋白酶的 western blotting 检测

将 BL21(DE3)于 23 ℃培养，不同诱导条件下表达的 Ulp1 经 SDS-PAGE 电泳后，使用电转仪将蛋白转移至 PVDF 膜上，PBST 清洗三次，每次 5 min。使用

5%的脱脂奶粉封闭一个小时，加入 HRP 标记的鼠抗 His_6 抗体（1:10000），室温孵育 1 h，PBST 清洗三次，每次 5 min，使用化学发光的方法显影，曝光时间 1 s。

1.2.4 SUMO 蛋白酶 Ulp1 和 scFv 的纯化

将 psvT7-ulp1-BL21(DE3)按照最优的发酵条件进行诱导表达，5000×g 收集菌体，加入与培养基等体积的上样缓冲液（20 mmol/L $NaH_2PO_4·2H_2O$、50 mmol/L NaC，pH=8.0）重悬。冰上预冷后进行超声破碎，破碎时间 25 min，8000×g 离心收集上清。将上清用 0.22 μm 针头式滤器进行过滤，作为待纯化的样品。

实验采用 AKTA-purifier 蛋白纯化仪进行纯化，将滤出液经过 Ni agarose 蛋白纯化柱进行亲和层析，使用上样缓冲液平衡 5 CV 以洗去未结合的杂蛋白，再用洗脱缓冲液（20 mmol/L $NaH_2PO_4·2H_2O$，50 mmol/L NaCl，250 mmol/L 咪唑，pH=8.0）洗脱，收集洗脱峰。将收集的蛋白进行 SDS-PAGE 检测。

将最优条件下发酵的融合蛋白 scFv 按重组蛋白 Ulp1 破碎方法进行超声破碎处理，将过滤后的蛋白上清经过 Ni agarose 蛋白纯化柱进行亲和层析，采用分段洗脱的方式进行洗脱，收集 50 mmol/L 咪唑洗脱的蛋白和 125 mmol/L 咪唑洗脱的蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 SUMO 蛋白酶 Ulp1 酶活测定

根据 Thermofisher 公司的 SUMO 蛋白酶活定义，在 30℃条件下反应 1 小时，能够切割 2 μg 的反应底物达 85%以上所需的酶量定义为一个活性单位。以实验室纯化的 SUMO-EGFP（1556.667μg/ml）为底物蛋白，在 10×SUMO Protease buffer（500 mmol/L Tris-HCl、1.5 mol/L NaCl、pH 8.0、2% Igepal、10 mmol/L DTT，Genecopoeia）中，分别加入 0、0.5、1.0、1.3、1.5、1.7、1.9、2.0 μl 重组蛋白 Ulp1（99.11 μg/ml）如表 2，30 ℃酶切 1 h 后进行 SDS-PAGE 检测，通过蛋白灰度分析计算纯化蛋白酶活和比酶活。

表 2 SUMO 蛋白酶酶切体系

Table 2 digestion system of SUMO protease

system（40 μl）	1	2	3	4	5	6	7	8
SUMO-EGFP(μg)	15.57	15.57	15.57	15.57	15.57	15.57	15.57	15.57
Ulp1(ng)	0	49.555	99.11	128.843	148.665	168.487	188.309	198.22
10×SUMO Protease buffer（μl）	4	4	4	4	4	4	4	4
dd H_2O	26	25.5	25.	24.7	24.5	24..3	24.1	24

1.2.6 ulp1 酶活特性分析

（1）不同时间酶切效率，在表 2 反应体系中，仅加入 1.5 μl 纯化的 Ulp1 蛋白酶（148.665 ng），在 30℃酶切 0、1、2 、5、10、15、20、30、45、60 min，加入 10 μl 5×loading buffer，100℃煮沸 5 min，经 SDS-PAGE 检测，通过灰度扫描，确定不同时间的酶切效率。

（2）不同缓冲体系的酶切效率，以 15.57 μg SUMO-EGFP 为底物，加入 2 μl 纯化的 Ulp1 蛋白酶，加入 28 μl 5 种不同的缓冲液，如表 3，30 ℃酶切 60 min 后，经 SDS-PAGE 进行酶切效率分析。

表 3　SUMO 蛋白酶酶切体系

Table 3 digestion system of SUMO protease

system（40 μl）	SUMO-EGFP(μg)	Ulp1（ng）	缓冲液
1	15.57	198.22	蛋白纯化上样缓冲液（20 mmol/L $NaH_2PO_4{\cdot}2H_2O$、50 mmol/L NaCl，pH=8.0）
2	15.57	198.22	蛋白纯化洗脱缓冲液（20 mmol/L $NaH_2PO_4{\cdot}2H_2O$、50 mmol/L NaCl、250mmol 咪唑 pH=8.0）
3	15.57	198.22	高盐缓冲液（250 mmol/L Tris-HCl，250 mmol/L NaCl，pH=8.0）
4	15.57	198.22	PBS（pH 7.4）
5	15.57	198.22	10×SUMO Protease buffer(稀释 10 倍)

（3）不同温度酶切效率，在表 2 反应体系中，加入 148.665 ng 纯化的 Ulp1 蛋白酶，在 30、37、42、47、50、60 ℃酶切 1 h，并于 4 ℃酶切 12 h，经 SDS-PAGE 进行酶切效率分析。

（4）米氏常数的测定：加入不同量的底物 SUMO-EGFP，于 10×SUMO buffer 中，30 ℃酶切 60 min，测定 Ulp1 的酶切效率，采用双倒数作图确定 V_m 和 K_m。

1.2.7 融合蛋白 SUMO-scFv 的酶切及 scFv 的纯化

取 125 mmol/L 咪唑浓度下收集的洗脱峰经超滤管浓缩（5000×g，10 min）在蛋白浓缩液中直接加入纯化的 Ulp1，4 ℃过夜酶切，加入 5×loading buffer，100℃ 处理 5 min，通过 SDS-PAGE 检测酶切效率。

确定酶切效率在 90%以上，将酶切后的蛋白混合物通过 GE 公司 HiPrep 26/10 Desalting 进行脱盐，将缓冲液置换成 Ni-NTA 蛋白上样缓冲液，以去除蛋白溶液里的咪唑，方便进行第二次蛋白纯化。将脱盐后的蛋白再次使用 Ni-NTA 进行纯化，His-SUMO 标签、Ulp1、未完全切割的 SUMO-scFv 蛋白可以与 Ni-NTA 结合，而 scFv 不含 His_6 标签，收集流穿液即为不含标签的 scFv。

2　结果

2.1 重组质粒 psvT7-sumo-scFv 和 psvT7-ulp1 的构建

利用引物 His-sumo-F 和 sumo-R 扩增出 *sumo* 片段，引物 scFv-F 和 scFv-R 扩

增出 *scFv* 片段，经核酸电泳检测（图 2a，泳道 2，泳道 3），*sumo* 片段大小约 350 bp，与理论大小 342 bp 大小相符；scFv 约 700 bp，与理论大小 729 bp 相符。其中 *sumo* 片段与 scFv 具有 26 bp 的重叠片段，以回收的 *sumo* 基因与 *scFv* 基因为模板，通过融合 PCR，得到 *sumo-scFv* 片段，根据核酸检测结果（图 2a，泳道 1），与理论值 1074 bp 大小一致。将重组质粒 psvT7-sumo-scFv 进行测序，测序结果与目的序列一致，证实质粒 psvT7-sumo-scFv 构建正确。

将重组质粒 psvT7-ulp1 使用 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ进行酶切验证，根据电泳结果（图 2b），*ulp1* 基因片段大小与理论值一致，经测序，测序结果与 Ulp1 的核苷酸序列完全一致，证实 *ulp1* 基因已经成功连接至表达载体中，成功构建重组质粒 psvT7-ulp1。

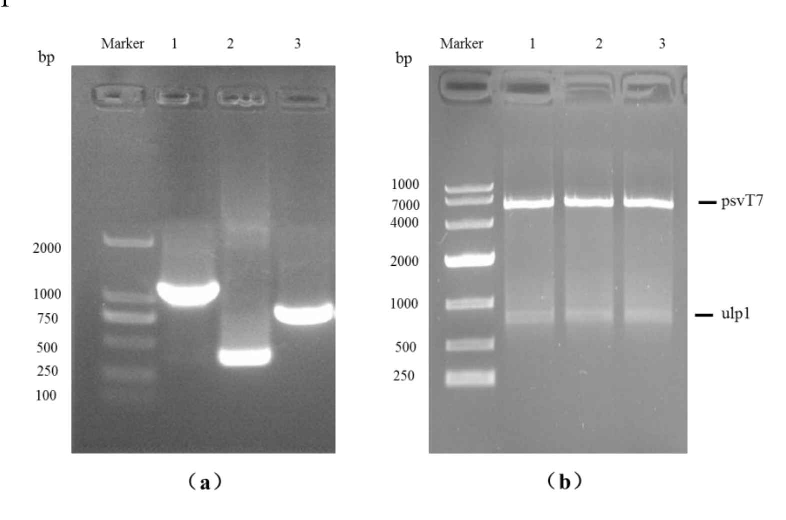


图 2　融合 PCR 扩增基因 *sumo-scFv* 和重组质粒 psvT7-ulp1 酶切验证

Fig 2　Overlap PCR amplification and double enzyme digestion of recombinant plasmid psvT7-ulp1

（a）融合 PCR 扩增基因 *sumo-scFv*。泳道 1：融合基因 *sumo-scFv*；泳道 2：*sumo* 基因片段；泳道 3：*scFv* 基因片段。（b）重组质粒 psvT7-ulp1 双酶切验证。(a) Overlap PCR amplification 1:*sumo-scFv*; 2 *sumo*; 3 *scFv*　(b) Double enzyme digestion of recombinant plasmid psvT7-ulp1

2.2 SUMO 蛋白酶 Ulp1 的表达条件优化及 Western blotting 鉴定

按照终 OD_{600} 为 0.05 转接到 25 ml TB/SB（含 15 μg/ml 四环素）发酵培养基后，在 30 ℃，230 rpm 培养 5 h 和 7 h，分别加入 IPTG，终浓度分别为 0.05 mmol/L 和 0.1 mmol/L，同时降温为 23 ℃和 16 ℃进行诱导，分别诱导培养 16 h 后，收集菌体通过分离胶浓度为 12%，浓缩胶为 5%的 SDS-PAGE 进行蛋白检测。由图 3 所知，在 23 ℃和 16 ℃诱导条件下，Ulp1 均为可溶性表达，且 23 ℃菌体生长速度快，蛋白表达量高。BL21 trxB(DE3)是硫氧还蛋白还原酶突变株，能提高细胞质内氧化环境，，能有效提高含二硫键蛋白的正确折叠和表达。但根据

SDS-PAGE 结果，由于 Ulp1 不含较多二硫键，相比于 BL21 trxB(DE3)菌株，宿主采用 BL21(DE3)较好，Ulp1 表达量高，最优的表达条件为移种后 7 h 加入诱导剂，IPTG 的终浓度为 0.1 mmol/L，诱导剂加入太早，影响菌体生长，且诱导蛋白表达对菌体也有一定影响，最终的 OD_{600} 值低，得到 SUMO 蛋白酶较少。据灰度分析，最终 SUMO 蛋白酶的表达量占菌体总蛋白的 34.5%，经过蛋白灰度分析，确定重组蛋白 Ulp1 的表达量为 190 mg/L。经 Western blotting 分析表明（图 4），重组蛋白 Ulp1 可以特异性的与 HRP-鼠抗 His_6 抗体发生特异性反应。

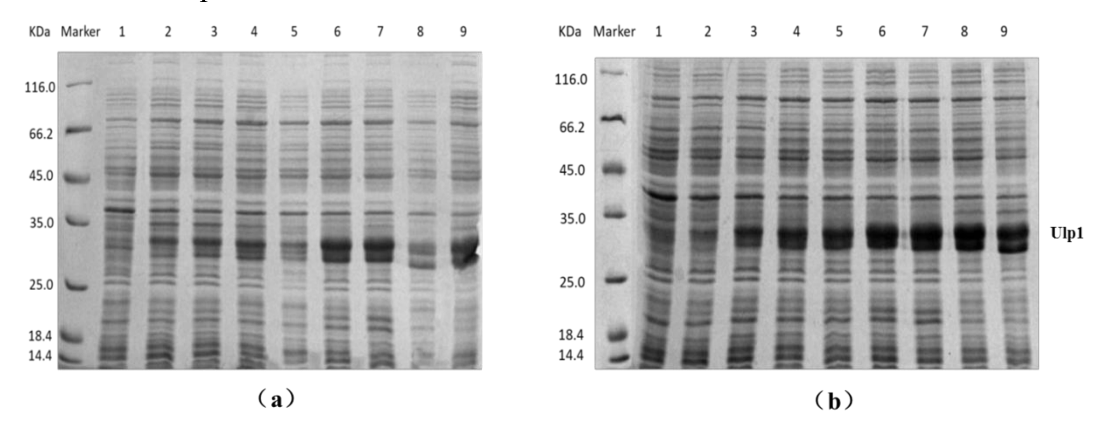


图 3　SUMO 蛋白酶的诱导表达

Fig 3 SDS-PAGE analysis of expression SUMO Protease.

（a）Ulp1 在大肠杆菌 BL21 trxB(DE3)的表达情况 泳道 1：未诱导；泳道 2、4：移种后 5 h，分别加入终浓度为 0.05 mml/L、0.1 mmol/L IPTG，于 16 ℃发酵培养破碎上清；泳道 3、5：移种后 7 h，分别加入终浓度为 0.05 mml/L、0.1 mmol/L IPTG，于 16 ℃发酵培养破碎上清；泳道 6、8：移种后 5 h，分别加入终浓度为 0.05 mml/L、0.1 mmol/L IPTG，于 23℃发酵培养破碎上清；泳道 7、9：移种后 7 h，分别加入终浓度为 0.05 mml/L、0.1 mmol/L IPTG，于 23℃发酵培养破碎上清（b）Ulp1 在大肠杆菌 BL21 (DE3)的表达情况 泳道 1：未诱导；泳道 2、4：移种后 5 h，分别加入终浓度为 0.05 mml/L、0.1 mmol/L IPTG，于 16 ℃发酵培养破碎上清；泳道 3、5：移种后 7 h，分别加入终浓度为 0.05 mml/L、0.1 mmol/L IPTG，于 16 ℃发酵培养破碎上清；泳道 6、8：移种后 5 h，分别加入终浓度为 0.05 mml/L、0.1 mmol/L IPTG，于 23 ℃发酵培养破碎上清；泳道 7、9：移种后 7 h，分别加入终浓度为 0.05 mml/L、0.1 mmol/L IPTG，于 23 ℃发酵培养破碎上清　(a)SDS-PAGE analysis of supernatant by ultrasound broken of the protein Ulp1 expression in BL21 trxB(DE3)　1: without induction; 2,4: After transferred for 5 h,the supernatant of BL21 trxB(DE3) containing psvT7-ulp1 induced with 0.05 mml/L,0.1 mmol/L IPTG at 16 ℃; 3,5: After transferred for 7 h,the supernatant of BL21 trxB(DE3) containing psvT7-ulp1 induced with 0.05 mml/L,0.1 mmol/L IPTG at 16 ℃; 6,8: After transferred for 5 h,the supernatant of BL21 trxB(DE3) containing psvT7-ulp1 induced with 0.05 mml/L,0.1 mmol/L IPTG at 23 ℃; 7,9: After transferred for 7 h,the supernatant of BL21 trxB(DE3) containing psvT7-ulp1 induced with 0.05 mml/L,0.1 mmol/L IPTG at 23 ℃ (b)SDS-PAGE analysis of supernatant by ultrasound broken of the protein Ulp1 expression in BL21 (DE3)　1: without induction; 2,4: After transferred for 5 h, the supernatant of BL21 (DE3) containing psvT7-ulp1 induced with 0.05 mml/L,0.1 mmol/L IPTG at 16 ℃; 3,5: After transferred for 7 h, the supernatant of BL21 (DE3) containing psvT7-ulp1 induced with 0.05 mml/L,0.1 mmol/L IPTG at 16 ℃; 6,8: After transferred for 5 h,the supernatant of BL21 (DE3) containing psvT7-ulp1 induced with 0.05 mml/L, 0.1 mmol/L IPTG at 23 ℃; 7,9: After transferred for 7 h, the supernatant of BL21 (DE3) containing psvT7-ulp1 induced with 0.05 mml/L,0.1 mmol/L IPTG at 23 ℃.

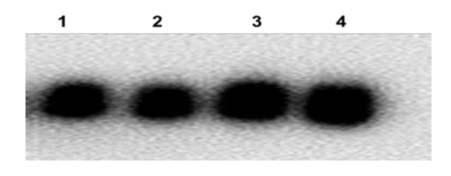


图 4 Ulp1 的 Western blotting 鉴定

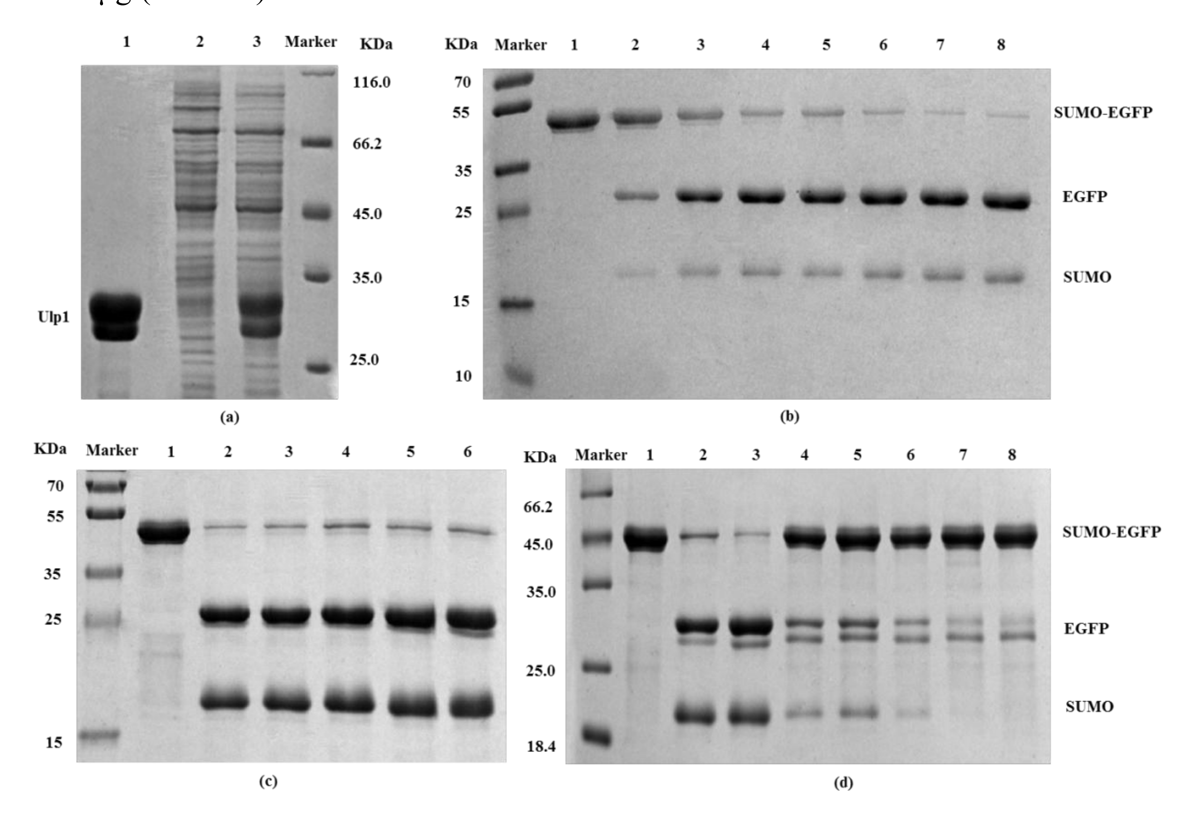
Fig 4 Identification of Ulp1 by Western blotting

泳道 1-2：菌种 psvT7-ulp1-BL21(DE3)移种后 5 h，分别加入终浓度为 0.05 mml/L、0.1 mmol/L IPTG，于 23 ℃发酵培养，破碎上清 Western blotting 鉴定；泳道 1-2：菌种 psvT7-ulp1-BL21(DE3)移种后 7 h，分别加入终浓度为 0.05 mml/L、0.1mmol/L IPTG，于 23 ℃发酵培养，破碎上清 Western blotting 鉴定　1-2: After transferred for 5h,*E.coli* BL21(DE3) containing psvT7-ulp1 induced with 0.05 mml/L,0.1mmol/L IPTG at 23 ℃；　3-4: After transferred for 5 h,*E.coli* BL21(DE3) containing psvT7-ulp1 induced with 0.05 mml/L,0.1 mmol/L IPTG at 23 ℃

2.3　Ulp1 纯化、酶活测定及酶活特性分析

本实验采用的 Roche Ni agarose 的亲和柱，是 Ni-NTA 琼脂糖凝胶，因为它螯合了四价，剩余两价，所以在相同条件下洗脱目标蛋白的咪唑浓度 Ni-NTA 比 Ni-IDA 的要低，与杂蛋白的非特异性结合弱，蛋白的纯度更高。收集蛋白纯化的洗脱峰和流穿液进行 SDS-PAGE 检测，如图 5 a 所示，蛋白挂柱效果好，蛋白纯度高于 95%。并通过脱盐柱进行脱盐处理，于 4 ℃保存于酶保存液（250 mmol/L Tris-HCl，250 mmol/L NaCl）中通过 BCA 蛋白定量试剂盒，测定 Ulp1 的浓度为 99.11 μg/ml，SUMO-EGFP 的标品的蛋白浓度为 1556.667 μg/ml，将纯化的重组蛋白 Ulp1 稀释后按表 2 的体系加入 SUMO-EGFP 反应体系中，30 ℃酶切 1 h，经 SDS-PAGE 检测（图 5 b），通过蛋白灰度分析，加入 1.5 μl 稀释后 Ulp1 即可达到 85%的切割效率，经计算，纯化的 SUMO 蛋白酶 Ulp1 的酶活为 5.19 U/μl，比酶活为 5.23×10^4 U/mg。将纯化的 Ulp1 按表 3 加入到 5 种不同的缓冲体系（蛋白纯化上样缓冲液、蛋白纯化洗脱缓冲液、高盐缓冲液、PBS、10×SUMO Protease buffer 中，30℃酶切 1 h，不同的缓冲体系中均表现出良好的切割效果（图 5c），即使在咪唑和高盐的存在下，酶切效果没有明显的影响。为了研究不同温度对 Ulp1 酶活的影响，按表 2 中的缓冲体系进行酶切反应，将缓冲体系于 30、37、42、47、50、60 ℃预热 5 min，加入 148.665 ng 重组蛋白 Ulp1，反应 1 h，同时 4 ℃　酶切 12 h，经 SDS-PAGE 鉴定（图 5 d），30 ℃酶切 1 h 效果最好，4 ℃过夜酶切也能达到较好的效果，对于一些不稳定的蛋白可以采用 4 ℃过夜酶切。而当温度高于 30 ℃以后，Ulp1 酶活明显下降，当反应温度高于 50 ℃后，酶活几乎完全丧失，因此对于较稳定的 SUMO 融合蛋白应采用不高于 30 ℃温度进行酶切反应。为了确定不同时间的酶切效果，在表 2 反应体系中，仅加入 1.5 μl 纯化的 Ulp1 蛋白酶（148.665 ng），在 30 ℃酶切 0、1、2 、5、10、15、20、30、45、

60 min，经 SDS-PAGE 检测（图 5 e），以未切割的底物 SUMO-EGFP 的条带为参考条带，对切割后剩余的 SUMO-EGFP 进行相对定量，作时间-相对剩余底物的曲线，如图 5 g 所示，前 5 min，酶切速度最快，切割效率为 35%以上，前 20 min 的酶切效率可达 70%以上，20 min 后，酶切速率降低，最终 1 h 后能达到 85%的酶切效率。为了测定 Ulp1 米氏常数，以不同浓度的 SUMO-EGFP 为底物，测定 Ulp1 的蛋白酶活性，经 SDS-PAGE 鉴定，如图 5 f，以已知含量的 BSA 为参考条带，通过灰度分析，对切割下来的 SUMO 标签进行相对定量，确定 SUMO 的浓度。以已知底物浓度的倒数 1/S 为横坐标，以 1/V 为纵坐标，得到 Ulp1 的双倒数曲线如图 5 h 所示，经米氏方程计算，得到 Ulp1 的表观米氏常数 Km=0.359 g/L，Vm=5.10 μg/(mL·min)。



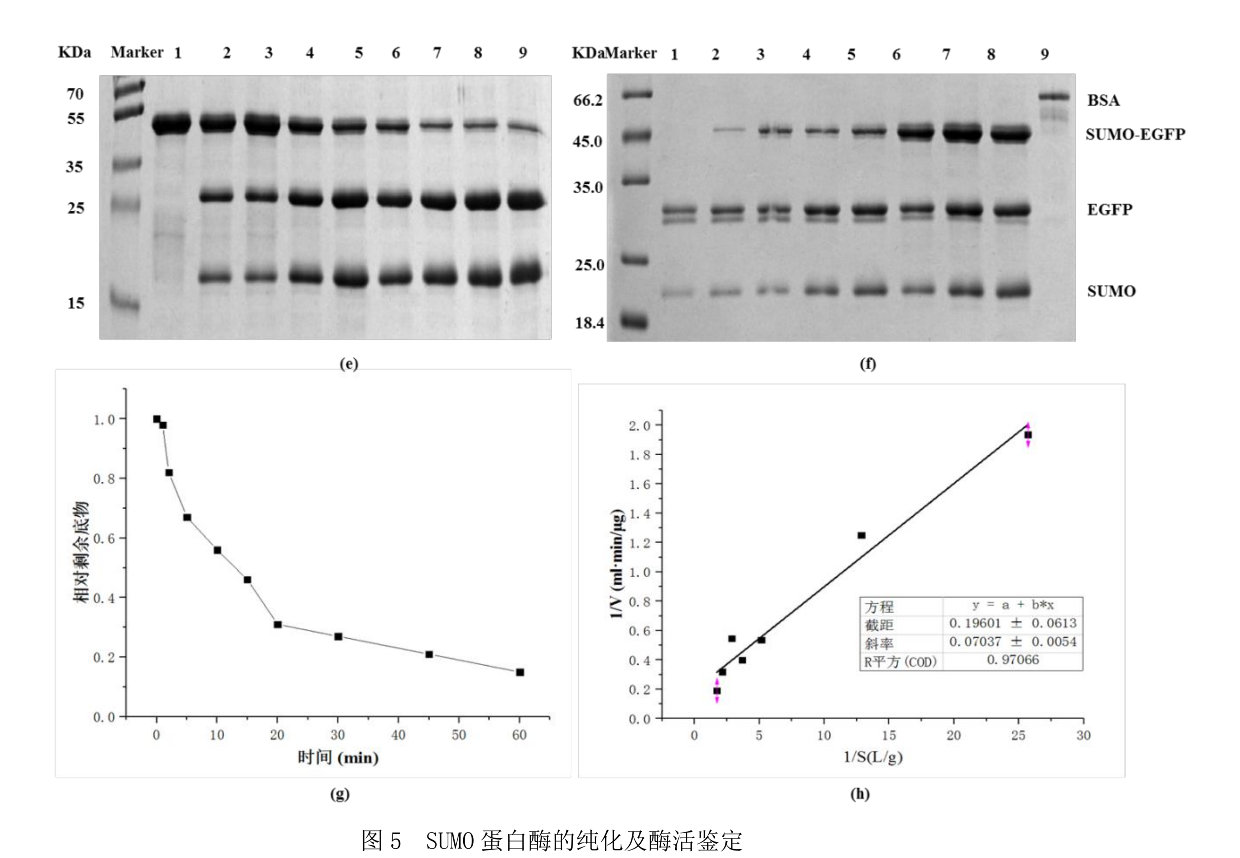


图 5　SUMO 蛋白酶的纯化及酶活鉴定

Fig 5　purification of SUMO Protease and identification of enzyme activity.

（a）SUMO 蛋白酶 Ulp1 的纯化 泳道 1：纯化的 Ulp1；泳道 2：流穿液；泳道 3：菌体破碎离心后上清（b）Ulp1 酶活性鉴定泳道 1-8：以 SUMO-EGFP 为底物，分别加入纯化的 Ulp1 的量为 0、0.5、1.0、1.3、1.5、1.7、1.9、2.0 μl 进行酶切，酶切时间 1 h （c）不同缓冲体系中 Ulp1 的酶切效率 泳道 1：蛋白纯化上样缓冲液；泳道 2：蛋白纯化洗脱缓冲液；泳道 3：高盐缓冲液；泳道 4：PBS 缓冲液；泳道 5：Genecopoeia 公司缓冲液 （d）不同温度的酶切效率，泳道 1：未酶切；泳道 2：4℃ 酶切 12 h；泳道 3-8，分别于 30、37、42、47、50、60 ℃ 酶切 1 h （e）不同时间酶切效率，泳道 1-9 酶切时间 0、2、1、5、10、15、20、30、45 min （f）不同底物浓度的酶切效率 泳道 1-8：底物 SUMO-EGFP 的加入量为 1、2、3、5、7、9、12、15 μl (g)不同时间酶切效率曲线 (h)Ulp1 米氏方程 (a) purification of SUMO Protease Ulp1　1: purification of Ulp1;　2: Flow through;　3: Protein solution by ultrasound broken　(b) identification of Ulp1 activity 1-8:the purified SUMO-EGFP substrates digested with 0,0.5,1.0,1.3,1.5,1.7,1.9,2.0 μl purified Ulp1 (c) Ulp1 cleavage efficiency in different buffer systems　1: Protein Purification Loading Buffer; 2: Protein Purification Elution Buffer; 3: High Salt Buffer; 4: PBS Buffer; 5: Buffer Provided by Genecopoeia　(d) Enzyme digestion efficiency at different temperatures　1: not digested; 2: digestion at 4 ° C for 12 h;3-8, digested at 30,37,42,47,50,60° C for 1 h (e) Enzyme efficiency at different times　1-9 digestion time 0,2,1,5,10,15,20,30,45 min (f) Cleavage efficiency at different substrate concentrations　1-8: Substrate SUMO-EGFP was added in an amount of 1,2,3,5,7,9,12 and 15 μl（g）Enzyme digestion efficiency curve at different times（h）Plot of Michaelis-Menten equation of Ulp1.

2.4　SUMO-scFv 表达条件的优化及纯化

按照终 OD_{600} 为 0.05 转接到 25 ml TB/SB（含 15 ug/ml 四环素）发酵培养基后，在 30 ℃，230 rpm 培养 5 h 和 7 h 后加入 IPTG，浓度分别为 0.05 mmol/L 和 0.1 mmol/L，23℃，230 rpm 诱导 16 h 后，12000×g 离心收集菌体。温度对 scFv 的可溶性表达有一定的影响，温度过高，蛋白合成速率高，蛋白折叠错误易形成包涵体；温度过低，菌体生长速度慢，蛋白表达量低。根据先前的研究，23 ℃

低温诱导可以减少蛋白的错误折叠而形成包涵体。通过 SDS-PAGE 检测（图 6a），融合 His-SUMO 串联标签后，scFv 的大小约 42 KDa，最优的表达条件为移种后 7 h 加入 IPTG，IPTG 的终浓度为 0.05 mmol/L。其中表达宿主采用硫氧还蛋白还原酶突变株 BL21 trxB(DE3)，提高胞内的氧化环境，更有利于 scFv 链内二硫键的形成，有利于可溶性表达。

以优化后的蛋白表达条件进行单链抗体的发酵，16 h 后离心收集菌体，加入与培养基等体积的 Ni-NTA 蛋白上样缓冲液，重悬菌体后超声破碎，8000×g 收集上清（图 6b 泳道 1）进行蛋白纯化，采用分段洗脱的方式，在 50 mmol/L 咪唑的浓度下，洗脱下杂蛋白（图 6b 泳道 2），随后提高咪唑浓度至 150 mmol/L，可竞争的洗脱 scFv，得到高纯度的 SUMO-scFv（图 6b 泳道 3-4）。

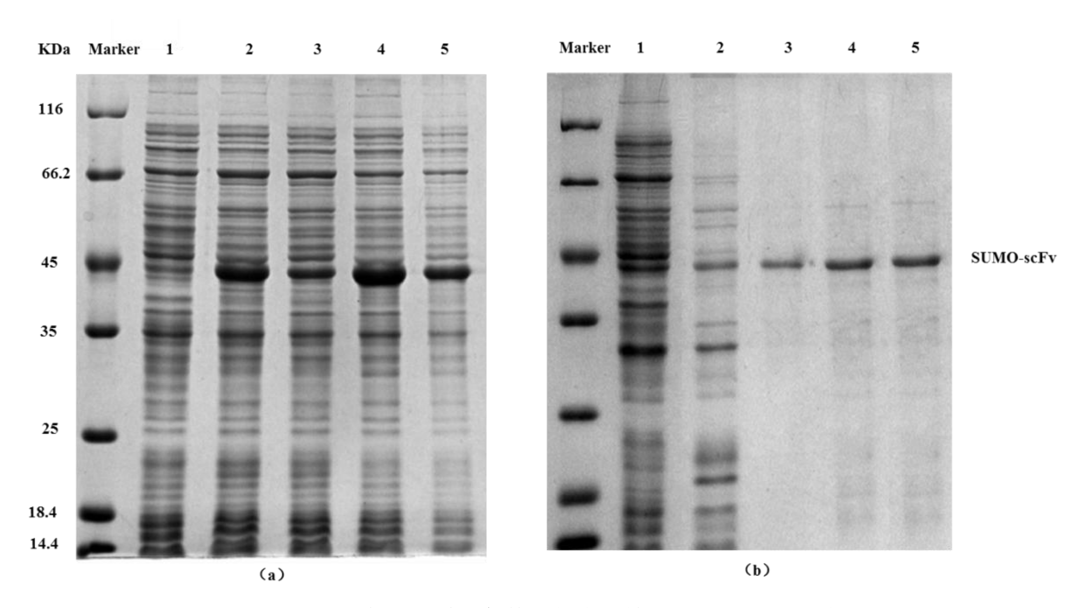


图 6　SUMO-scFv 在不同诱导条件下的表达情况及 SUMO-scFv 纯化

Fig 6 SDS-PAGE analysis of expression and the purification of SUMO-scFv

（a）不同表达条件下 SUMO-scFv 的表达情况　泳道 1：未诱导；泳道 2-3：移种后 5 h 加入 IPTG，浓度分别为 0.05 mmol/L 和 0.1 mmol/L，诱导温度 23℃；泳道 4-5：移种后 7 h 加入 IPTG，浓度分别为 0.05 mmol/L 和 0.1 mmol/L，诱导温度 23℃。（b）SUMO-scFv 纯化　泳道 1：菌体超声破碎上清；泳道 2：50 mmol/L 咪唑洗脱；泳道 3-4：150 mmol/L 咪唑洗脱　(a) The expression of SUMO-scFv under different expression conditions　1: without induction;　2:0.05 mmol/L 5 h 23 ℃; 3: 0.1 mmol/L 5 h 23℃; 4: 0.05 mmol/L 7 h 23℃; 5: 0.1 mmol/L 7 h 23℃. (b) The purification of SUMO-scFv　1:Supernatant of protein solution by ultrasound broken; 2: Elution by 50 mmol/L Imidazole; 3-4 Elution by 150 mmol/L Imidazole.

2.5　融合蛋白 SUMO-scFv 的酶切及 scFv 的纯化

将收集的 scFv 进行超滤浓缩，直接加入表达纯化的 Ulp1 混匀，4 ℃过夜酶切，经过 SDS-PAGE 电泳检测，其中分离胶为 15%，浓缩胶为 5%。如图 8a 所示，SUMO-scFv 融合蛋白切割为 SUMO 标签和 scFv 蛋白（27 KDa）两个部分，切割效率可高达 90%。Ulp1 在较高浓度咪唑存在的情况下仍可以保持较高的活

性。

SUMO-scFv 切割后，混合蛋白含有切割后的 SUMO 标签、scFv、Ulp1 和未切割的 SUMO-scFv，将酶切后的蛋白混合物通过脱盐柱 HiPrep 26/10 Desalting 进行脱盐换液，重新进行 Ni-NTA 纯化，含 His_6 的 SUMO、Ulp1、未完全切割的 SUMO-scFv 可与 Ni-NTA 结合，收集流穿液得到不含标签的 scFv（图 7b）。

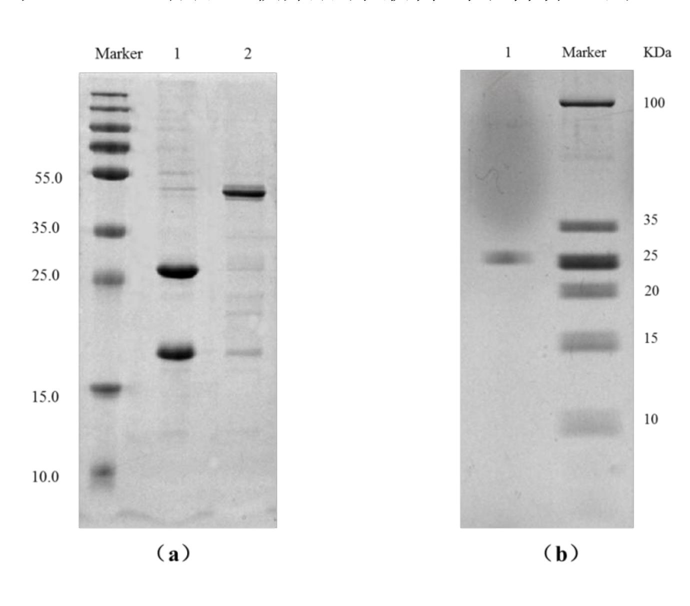


图 7　SUMO- scFv 蛋白酶切及 scFv 纯化

Fig 7 Cleavage analysis of SUMO-scFv and purification .

（a）SUMO-scFv 酶切分析，泳道 1：SUMO-scFv 通过纯化 Ulp1 酶切；泳道 2：未酶切的 SUMO-scFv。（b）scFv 纯化。

(a) Cleavage analysis of SUMO-scFv　1:SUMO-scFv cleaved by purified Ulp1; 2:uncleaved (b) purification of scFv

3　讨论

SUMO 在真核生物中具有较高的稳定性，能防止 SUMO 修饰后的蛋白被蛋白酶水解。由于高稳定的 SUMO 结构，当融合到靶蛋白的 N 端时，可以作为分子伴侣，提高靶蛋白的稳定性。SUMO 与不同性质的靶蛋白融合后，均可以被 SUMO 蛋白酶识别其三级结构，并准确的从 SUMO 末端的 Gly 切开 SUMO 和靶蛋白，且靶蛋白的 N 端无多余的氨基酸残留，对靶蛋白的生物活性没有影响[16]，因此 SUMO 可以作为大肠杆菌中蛋白表达的融合标签尤其是医药蛋白。但由于 SUMO 蛋白酶价格昂贵，限制了 SUMO 融合表达体系的运用。在本研究中，通过 Jcat 密码子优化合成酿酒酵母 SUMO 蛋白酶 Ulp1 编码 Leu403-Lys621 的基因序列，同时在基因的 N 端和 C 端均加入多聚组氨酸标签（His_6），成功表达并纯化了 SUMO 蛋白酶 Ulp1。纯化的 Ulp1 的酶活为 5.19 U/ul，比酶活为 5.23×10^4 U/mg，比酶活是文献报道[17]的 1.87 倍，根据先前研究[18]，Ulp1 在高温 37 ℃以上容易形成包涵体，30 ℃能减少包涵体的形成，文章采用 23 ℃进行重组蛋白

Ulp1 的诱导表达，均为可溶性表达，更有利于重组蛋白的正确折叠，相比于 16 ℃诱导，菌体生长更好。此外质粒 psvT7 为实验室构建并保存，其中在 T7 启动子后加入一段双回文序列，更能有效的控制蛋白的本底表达，减少蛋白本底表达对菌体生长的影响。在 Ulp1 的 N 端和 C 端均加入多聚组氨酸标签后，双标签对蛋白纯化柱的结合效果更好，一次纯化即可达到 95%的纯度，且对蛋白的活性没有明显的影响，相比于在 N 端和 C 端分别加入 GST 标签和 His_6 标签，纯化方式更简单[19]。但 Ulp1 表达在 27 KDa 处有两条条带，根据质谱分析（图略），两条带均为 SUMO 蛋白酶 Ulp1，产生两条带的原因可能是因为蛋白酶被降解，但具体原因还需要进一步研究。

scFv 的表达纯化是抗体工业化的瓶颈，在大肠杆菌中一般以包涵体的形式表达，由于 scFv 结构简单，只含有重链和轻链的可变区，protein A、 protein L 亲和柱并不适用所有 scFv 的亲和纯化。本研究中采用串联多聚组氨酸和 SUMO 作为融合标签用于 scFv 的表达纯化，可溶性的表达了 SUMO-scFv。限制 SUMO 融合表达体系的运用的另一方面是酶切反应体系复杂，需要对融合蛋白进行脱盐处理，并在特定的缓冲体系（50 mmol/L Tris-HCl、0.15 mol/L NaCl、pH 8.0、0.2% Igepal、1 mmol/L DTT）中反应。研究发现，即使在高盐和含咪唑的缓冲液中，酶活没有明显影响，仍可以达到较好的酶切效果，并不需要特定的缓冲体系，实验中对融合蛋白 SUMO-scFv 进行酶切时，直接将咪唑洗脱的 Ulp1 加入融合蛋白 SUMO-scFv 中，4 ℃过夜酶切，低温切割可以减少对 scFv 蛋白活性的影响，且切割效率仍可达到 90%以上，减少酶切前融合蛋白和 Ulp1 的脱盐等实验步骤。将酶切产物脱盐除去高浓度咪唑，重新经过 Ni-NTA 亲和层析，由于 SUMO 标签和 Ulp1 均含有多聚组氨酸标签，可以与镍柱结合并除去 SUMO 标签和 Ulp1，流穿即为不含标签的 scFv。

本文高效表达了 SUMO 蛋白酶 Ulp1，并建立了 SUMO 表达体系，在实验室得到了广泛的应用，由于 Ulp1 价格昂贵，因此表达高活力的 Ulp1 具有较高的经济价值。通过 SUMO 融合表达体系，成功的可溶性表达了 scFv，酶切后通过两次 Ni 柱纯化，得到 N 端无多余氨基酸的 scFv，简化了酶切操作步骤，提供了 scFv 纯化的新思路。但研究中仍发现，虽然多聚组氨酸分子量小，对蛋白折叠基本没有影响，常作为蛋白的纯化标签，但多聚组氨酸也有其问题，很容易折叠在蛋白

的内部，导致挂柱效果差等，不利于纯化，对于挂柱效果不好的蛋白可以采用其他串联标签的方式如 GST-SUMO、StreΠ-SUMO 等，根据不同的蛋白选用不同的串联标签，更易得到高纯度的目标蛋白。除了将多聚组氨酸与 SUMO 串联，也可以用 MBP、GST、Trx 等[13]其他促溶标签与 SUMO 串联，有望进一步提高蛋白的可溶性。

REFERENCES

[1] Malakhov M P，Mattern M R，Malakhov Q R，et al. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. Journal of Structural and Functional Genomics, 2004，5(1-2)：75-86.

[2] Johnson E S. Protein modification by SUMO. Annu Rev Biochem, 2004，73：355-382.

[3] Wang H Y，Xiao Y C，Fu L J，et al. High-level expression and purification of soluble recombinant FGF21 protein by SUMO fusion in *Escherichia coli*. BMC Biotechnology, 2010，10：14.

[4] Su Z J，Huang Y D，Zhou Q N，et al. High-level expression and purification of human epidermal growth factor with SUMO fusion in *Escherichia coli*. Protein Peptide Letters, 2006，13(8)：785-792.

[5] Wu X P，Nie C J，Huang Z F，et al. Expression and purification of human keratinocyte growth factor 2 by fusion with SUMO. Mol Biotechnol, 2009，42(1)：68-74.

[6] Ronau J A，Beckmann J F，Hochstrasser M. Substrate specificity of the ubiquitin and Ubl proteases. Cell Reserch, 2016. 26(4)：441-456.

[7] Butt T R，Edavettal S C，Hall J P，et al. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. Protein Expression and Purification，2005，43(1)：1-9.

[8] Ozaki C Y，Silveira C R，Andrade F B，et al. Single Chain Variable Fragments Produced in *Escherichia coli* against Heat-Labile and Heat-Stable Toxins from Enterotoxigenic *E. coli*. PLoS One, 2015，10(7)：e0131484.

[9] Johdi N A，Harman R，Sanjuan I，et al. Production and binding analyses of a humanised scFv against a cryptic epitope on tumour-associated fibronectin. Protein Expression and Purification，2013，88(1)：157-163.

[10] Hjelm H，Sjodahl J，Sjoquist J. Immunologically active and structurally similar fragments of protein A from *Staphylococcus aureus*. European journal of biochemistry，1975，57(2)：395-403.

[11] Ishihara T，Kodoya T，Yoshida H，et al. Rational methods for predicting human monoclonal antibodies retention in protein A affinity chromatography and cation exchange chromatography. Structure-based chromatography design for monoclonal antibodies. Jounal of Chromatography A，2005，1093(1-2)：126-138.

[12] Roque A C，Silva C S，and Taipa M A. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: advances and perspectives. Jounal of Chromatography A, 2007，1160(1-2)：44-55.

[13] Marblestone J G，Edavetta S C，Lim Y，et al.Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. Protein Science，2006，15(1)：182-189.

[14] 刘萌，孙杨，杨艳坤，等.人-鼠嵌合单链抗体的构建及其在大肠杆菌中的高效可溶性表达

和发酵条件优化. 生物学杂志, 2016，33(6) ：1-6.

Liu M，SUN Y，Yang Y K，et al. Chimeric single-chain antibody efficient soluble expression in *Escherichia coli* and optimization of fermentation conditions. Journal of Biology，2016,33（6）：1-6

[15] Mossessova E and Lima C D. Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. Mol Cell, 2000，5(5) ：865-876.

[16] Lee C D，Sun H C，Hu S M，et al. An improved SUMO fusion protein system for effective production of native proteins. Protein Science，2008，17(7) ：1241-1248.

[17] Wang X，Liu H F，Liu Y W，et al. A Novel Strategy for the Preparation of Codon-Optimized Truncated Ulp1 and its Simplified Application to Cleavage the SUMO Fusion Protein. Protein J, 2016，35(2) ：115-123.

[18] 陈兴华，李校，苏志坚等. SUMO 蛋白酶活性片段的表达、纯化及活性测定.中国生物工程杂志. 2007, 27(3)：34~ 41.

Cheng X H，LI X，Su Z Z，et al. Expression, purification and activity determination of SUMO proteases active fragment. 2007, 27(3)：34~ 41.

[19] 傅俊华，王琪，尹杰超等. 融合蛋白 GST-Ulp1p 在大肠杆菌中的高效可溶性表达及其活性鉴定. 生物工程学报, 2010，26(6) ：837-842.

Fu J H，Wang Q，Yin J C，et al. Expression and characterization of soluble recombinant Ulp1p with glutathione S-transferase tag in *Escherichia coli*.Chinese Journal of Biotechnology，2010，26（6）：837-842

附录：ulp1 的基因序列

**CATATGCATCACCACCATCACCACCTGGTGCCGGAACTGAATGAGAAAGACGACGACCAGGTGCAGAAAGCCCTGGCCAGC
CGTGAAAACACCCAGCTGATGAACCGCGACAACATCGAGATCACCGTGCGTGACTTCAAGACCTTAGCCCCGCGCCGCTGGC
TGAACGATACCATTATCGAATTTTTTATGAAATATATTGAAAAAAGCACCCCGAACACCGTGGCATTTAACAGTTTCTTTTATAC
CAACCTGAGCGAGCGCGGTTATCAGGGCGTGCGCCGCTGGATGAAACGTAAGAAAACTCAGATTGATAAACTGGATAAAAT
CTTCACCCCGATCAACCTGAATCAGAGCCATTGGGCCCTGGGCATTATTGATCTGAAGAAGAAAACTATTGGCTATGTTGATA
GCCTGAGCAACGGCCCGAACGCCATGAGCTTCGCCATCCTGACCGATCTGCAGAAGTATGTGATGGAGGAGAGCAAGCACA
CCATCGGCGAGGATTTCGACCTGATCCATCTGGATTGCCCGCAGCAGCCGAACGGCTACGATTGCGGCATTTATGTGTGCATG
AACACCCTGTATGGCAGCGCCGATGCACCGCTGGATTTCGACTACAAGGACGCCATTCGCATGCGCCGCTTTATTGCCCACCT
GATCCTGACAGATGCCCTGAAATAACTCGAG**